

201307011A

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

ゲノム網羅的関連解析の大規模メタ解析を基盤としたcommon
diseaseのテーラーメイド医療実用化に関する研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 桃原 茂樹

平成26（2014）年 5月

目 次

I. 総括研究報告	
ゲノム網羅的関連解析の大規模メタ解析を基盤としたcommon diseaseのテーラーメイド医療実用化に関する研究-----	3
桃原 茂樹 東京女子医科大学	
II. 分担研究報告	
1. NF- κ B関連遺伝子における関節リウマチ発症に関わるrare variantsに関する研究-11	
山本 一彦 理化学研究所ゲノム医科学研究センター	
2. 次世代シーケンサーを用いた関節リウマチ関連rare variantの探索に関する研究-15	
松田 文彦 京都大学	
3. 血清ビタミンD値関連遺伝子多型と股関節骨折リスクとの関連に関する研究-----	19
桃原 茂樹、山中 寿 東京女子医科大学	
4. 抗CCP抗体陰性関節リウマチの原因遺伝子検索に関する研究-----	23
三森 経世 京都大学	
5. 疾患関連遺伝子の同定と臨床展開のための数理統計学的手法に関する研究-----	27
山田 亮 京都大学	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	29
IV. 研究成果の刊行物・別刷-----	35

I. 総括研究報告

総括研究報告書

ゲノム網羅的関連解析の大規模メタ解析を基盤とした
common diseaseのテーラーメイド医療実用化に関する研究

研究代表者 桃原 茂樹 東京女子医科大学医学部 教授

研究要旨：国際共同研究を通じて欧米人集団およびアジア人集団で構成された 10 万人以上のサンプルに対するゲノムワイド関連解析を実施し、42 の新規領域を含む、101 個の関節リウマチ感受性遺伝子領域を同定した。得られた感受性遺伝子情報を多様な生物学的・創薬データベースと統合するビッグデータ解析を通じて、関節リウマチの新たな病態が明らかになり（制御性 T 細胞におけるストン修飾機構、原発性免疫不全症候群や造血器悪性腫瘍との原因遺伝子の重複）、また新規治療薬候補を同定することができた（CDK4/6 阻害薬）。本研究の成果は、大規模ゲノム解析を通じて疾患病態の解明や新規創薬に貢献できる可能性を切り拓いたものであり、創薬基盤整備に寄与するものと考えられる。

研究分担者：山本 一彦
理化学研究所ゲノム医科学研究センター
チームリーダー

研究分担者：松田 文彦
京都大学大学院医学研究科附属ゲノム医学センター 教授

研究分担者：山中 寿
東京女子医科大学医学部 教授

研究分担者：三森 経世
京都大学大学院医学研究科内科学講座臨床免疫学 教授

研究分担者：山田 亮
京都大学大学院医学研究科附属ゲノム医学センター 教授

研究協力者：岡田 随象
理化学研究所ゲノム医科学研究センター
客員研究員

A. 研究目的

大規模なゲノム研究により関節リウマチの罹患リスクに関連した感受性遺伝子領域を同定する。また、同定された疾患感受性領域の情報をを用いたビッグデータ解析を通じて、関節リウマチの疾患病態の解明や common disease の創薬基盤整備を目指す。

B. 研究方法

本研究班を主体として結成された GARNET コンソーシアム（Genetics and Allied research in Rheumatic diseases Networking consortium）や、米国ハーバード大学を中心とした国際共同研究を通じて、欧米人集団およびアジア人集団で構成された 10 万人以上のサンプルを対象としたゲノムワイド関連解析を実施した。各コホートより得られた一塩基多型（SNP）ジェノタイプデータに対して 1000 Genomes Project 参照ゲノム配列に基づく遺伝子型の推定を行い、X 染色体を含む全ゲノム領域を網羅する 1,000 万 SNP における関節リウマチ罹患リスクとの因

果関係の評価した（担当：山本、松田、桃原、山田）。

関節リウマチ感受性遺伝子領域と多様な生物学的データベース（SNP の機能分類、遺伝子発現量解析、ヒストン修飾機構、メンデル型遺伝病、悪性腫瘍体細胞変異、ノックアウトマウス形質、PubMed 論文データテキストマイニング、蛋白質間相互作用、パスウェイ解析）との網羅的な照合を実施した。また、創薬データベース上に登録された既存もしくは臨床治験中のヒト疾患治療薬のターゲット遺伝子と疾患感受性遺伝子とのつながりを、蛋白-蛋白相互作用を考慮したネットワーク解析に基づき評価し新規治療薬候補を探し、新しいゲノム創薬手法を開発した。

その他、次世代シーケンサーを用いた rare variant 解析（担当 山本、松田）、長期観察コホートを用いた骨折リスク遺伝子の解析（担当 桃原、山中）、RA における重要なサブタイプである抗 CCP 抗体陰性関節リウマチの原因遺伝子検索（担当 三森）、疾患関連遺伝子の同定と臨床展開のための数理統計学的手法に関する研究（担当 山田）を行った。

（倫理面への配慮）

本研究は、各研究者の所属する機関内倫理審査委員会における審査を適切に行った上で実施された。DNA 試料の採取や臨床情報の取得は、インフォームドコンセントに基づき行われた。

C. 研究結果

ゲノムワイド関連解析を通じて、42 の新規領域を含む、101 個の関節リウマチ感受性遺伝子領域を同定した（SNP P 値 < 5.0×10^{-8} 。表 1）。感受性遺伝子領域内の SNP のリスクは人種間で正の相関関係を示し、欧米人およびアジア人の間で関節リウマチの遺伝的背景が共通していることが示唆された。

TNFRSF14-MMEL1	DNASE1L3-ABHD6-PXK	GRHL2	PLD4-AHNAK2
TNFRSF9	IL20RB	PVT1	RASGRP1
PADI4	CLNK	TRAF1-C5	LOC145837
MTF1-INPP5B	C4orf52	IL2RA	TXNDC11
LOC339442	TEC	PRKCG	IRF8
PTPN22	ANXA3	GATA3	C1QBP
CD2	IL2-IL21	10p14	MED1
IL6R	ANKRD55	ZNF438	IKZF3-CSF3
FCRL3	C5orf30	WDFY4	PTPN2
LY9-CD244	IL3-CSF2	ARID5B	CD226
FCGR2A	IRF4	RTKN2	TYK2
FCGR2B	CD83	SFTPD	ILF3
LOC100506023	HLA-DRB1	TRAF6-RAG1/2	CD40
PTPRC	ETV7	CD5	IFNGR2
LBH	NFKBIE	FADS1-FADS2-FADS3	RCAN1
REL	ATG5	ARAP1	RUNX1-LOC100506403
B3GNT2	TNFAIP3	CEP57	UBASH3A
SPRED2	PP1L4	ATM	ICOSLG-AIRE
AFF3	TAGAP	CXCR5	UBE2L3-YDJC
ACOXL	CCR6	ETS1	IL2RB
STAT4	JAZF1	CDK2	SYNGR1
CFLAR-CASP8	CDK6	CDK4	P2RY10
CD28	IRF5	SH2B3-PTPN11	IRAK1
CTLA4	BLK	COG6	
PLCL2	CCL19-CCL21	PRKCH	
EOMES	TPD52	RAD51B	

表 1：101 個の関節リウマチ感受性遺伝子領域の一覧

（赤字：本研究で新規同定した 42 の感受性遺伝子領域）

生物学的データベースとの網羅的なビッグデータ解析を通じて、これらの感受性領域が遺伝子発現量の調節機能を有していること、制御性 T 細胞における細胞特異的なヒストン修飾調節領域と重複していること、原発性免疫不全症候群および造血器悪性腫瘍の原因遺伝子群やノックアウトマウスで造血系・免疫機構関連の形質を示す遺伝子群と有意に共通していることが明らかとなった。主要適合抗原領域 (major histocompatibility [MHC] region) を除く 100 の関節リウマチ感受性遺伝子領域に含まれる 377 の遺伝子に対して、上記データベース情報に基づく絞込みを行い、関節リウマチの病態に機能的な寄与を与えると考慮される 98 遺伝子をリストアップした。

これらの機能的な遺伝子群に対する創薬データベース解析の結果、蛋白-蛋白相互作用を介したネットワークを通じて、関節リウマチ感受性遺伝子群と既存の関節リウマチ治療薬のターゲット遺伝子群が強固に結びついていることが判明した（リスク比=2.2, P 値=0.0035; トシリズマブに対する *IL6R* 遺伝子や JAK 阻害剤に対する *JAK1/2/3* 遺伝子など。図 1 上段）。

I. 総括研究報告

総括研究報告書

ゲノム網羅的関連解析の大規模メタ解析を基盤とした
common diseaseのテーラーメイド医療実用化に関する研究

研究代表者 桃原 茂樹 東京女子医科大学医学部 教授

研究要旨：国際共同研究を通じて欧米人集団およびアジア人集団で構成された 10 万人以上のサンプルに対するゲノムワイド関連解析を実施し、42 の新規領域を含む、101 個の関節リウマチ感受性遺伝子領域を同定した。得られた感受性遺伝子情報を多様な生物学的・創薬データベースと統合するビッグデータ解析を通じて、関節リウマチの新たな病態が明らかになり（制御性 T 細胞におけるストン修飾機構、原発性免疫不全症候群や造血器悪性腫瘍との原因遺伝子の重複）、また新規治療薬候補を同定することができた（CDK4/6 阻害薬）。本研究の成果は、大規模ゲノム解析を通じて疾患病態の解明や新規創薬に貢献できる可能性を切り拓いたものであり、創薬基盤整備に寄与するものと考えられる。

研究分担者：山本 一彦
理化学研究所ゲノム医科学研究センター
チームリーダー

研究分担者：松田 文彦
京都大学大学院医学研究科附属ゲノム医学センター 教授

研究分担者：山中 寿
東京女子医科大学医学部 教授

研究分担者：三森 経世
京都大学大学院医学研究科内科学講座臨床免疫学 教授

研究分担者：山田 亮
京都大学大学院医学研究科附属ゲノム医学センター 教授

研究協力者：岡田 随象
理化学研究所ゲノム医科学研究センター
客員研究員

A. 研究目的

大規模なゲノム研究により関節リウマチの罹患リスクに関連した感受性遺伝子領域を同定する。また、同定された疾患感受性領域の情報をを用いたビッグデータ解析を通じて、関節リウマチの疾患病態の解明や common disease の創薬基盤整備を目指す。

B. 研究方法

本研究班を主体として結成された GARNET コンソーシアム（Genetics and Allied research in Rheumatic diseases Networking consortium）や、米国ハーバード大学を中心とした国際共同研究を通じて、欧米人集団およびアジア人集団で構成された 10 万人以上のサンプルを対象としたゲノムワイド関連解析を実施した。各コホートより得られた一塩基多型（SNP）ジェノタイプデータに対して 1000 Genomes Project 参照ゲノム配列に基づく遺伝子型の推定を行い、X 染色体を含む全ゲノム領域を網羅する 1,000 万 SNP における関節リウマチ罹患リスクとの因

果関係を評価した（担当：山本、松田、桃原、山田）。

関節リウマチ感受性遺伝子領域と多様な生物学的データベース（SNP の機能分類、遺伝子発現量解析、ヒストン修飾機構、メンデル型遺伝病、悪性腫瘍体細胞変異、ノックアウトマウス形質、PubMed 論文データテキストマイニング、蛋白質間相互作用、パスウェイ解析）との網羅的な照合を実施した。また、創薬データベース上に登録された既存もしくは臨床治験中のヒト疾患治療薬のターゲット遺伝子と疾患感受性遺伝子とのつながりを、蛋白-蛋白相互作用を考慮したネットワーク解析に基づき評価し新規治療薬候補を探し、新しいゲノム創薬手法を開発した。

その他、次世代シーケンサーを用いた rare variant 解析（担当 山本、松田）、長期観察コホートを用いた骨折リスク遺伝子の解析（担当 桃原、山中）、RA における重要なサブタイプである抗 CCP 抗体陰性関節リウマチの原因遺伝子検索（担当 三森）、疾患関連遺伝子の同定と臨床展開のための数理統計学的手法に関する研究（担当 山田）を行った。

（倫理面への配慮）

本研究は、各研究者の所属する機関内倫理審査委員会における審査を適切に行った上で実施された。DNA 試料の採取や臨床情報の取得は、インフォームドコンセントに基づき行われた。

C. 研究結果

ゲノムワイド関連解析を通じて、42 の新規領域を含む、101 個の関節リウマチ感受性遺伝子領域を同定した（SNP P 値 $< 5.0 \times 10^{-8}$ 。表 1）。感受性遺伝子領域内の SNP のリスクは人種間で正の相関関係を示し、欧米人およびアジア人の間で関節リウマチの遺伝的背景が共通していることが示唆された。

TNFRSF14-MMEL1	DNASE1L3-ABHD6-PXK	GRHL2	PLD4-AHNAK2
TNFRSF9	IL20RB	PVT1	RASGRP1
PADI4	CLNK	TRAF1-C5	LOC145837
MTF1-INPP5B	C4orf52	IL2RA	TXNDC11
LOC339442	TEC	PRKQ3	IRF8
PTPN22	ANXA3	GATA3	C1QBP
CD2	IL2-IL21	10p14	MED1
IL6R	ANKRD55	ZNF438	IKZF3-CSF3
FCRL3	C5orf30	WDFY4	PTPN2
LY9-CD244	IL3-CSF2	ARID5B	CD226
FCGR2A	IRF4	RTKN2	TYK2
FCGR2B	CD83	SFTPD	ILF3
LOC100506023	HLA-DRB1	TRAF6-RAG1/2	CD40
PTPRC	ETV7	CD5	IFNGR2
LBH	NFKBIE	FADS1-FADS2-FADS3	RCAN1
REL	ATG5	ARAP1	RUNX1-LOC100506403
B3GNT2	TNFAIP3	CEP57	UBASH3A
SPRED2	PP1L4	ATM	ICOSLG-AIRE
AFF3	TAGAP	CXCR5	UBE2L3-YDJC
ACOXL	CCR6	ETS1	IL2RB
STAT4	JAZF1	CDK2	SYNGR1
CFLAR-CASP8	CDK6	CDK4	P2RY10
CD28	IRF5	SH2B3-PTPN11	IRAK1
CTLA4	BLK	COG6	
PLCL2	CCL19-CCL21	PRKCH	
EOMES	TPD52	RAD51B	

表 1：101 個の関節リウマチ感受性遺伝子領域の一覧

（赤字：本研究で新規同定した 42 の感受性遺伝子領域）

生物学的データベースとの網羅的なビッグデータ解析を通じて、これらの感受性領域が遺伝子発現量の調節機能を有していること、制御性 T 細胞における細胞特異的なヒストン修飾調節領域と重複していること、原発性免疫不全症候群および造血器悪性腫瘍の原因遺伝子群やノックアウトマウスで造血系・免疫機構関連の形質を示す遺伝子群と有意に共通していることが明らかとなった。主要適合抗原領域 (major histocompatibility [MHC] region) を除く 100 の関節リウマチ感受性遺伝子領域に含まれる 377 の遺伝子に対して、上記データベース情報に基づく絞込みを行い、関節リウマチの病態に機能的な寄与を与えると考慮される 98 遺伝子をリストアップした。

これらの機能的な遺伝子群に対する創薬データベース解析の結果、蛋白-蛋白相互作用を介したネットワークを通じて、関節リウマチ感受性遺伝子群と既存の関節リウマチ治療薬のターゲット遺伝子群が強固に結びついていることが判明した（リスク比=2.2, P 値=0.0035; トシリズマブに対する *IL6R* 遺伝子や JAK 阻害剤に対する *JAK1/2/3* 遺伝子など。図 1 上段）。

さらに、他疾患に対する既存の治療薬標的が関節リウマチ感受性遺伝子と重複している場合、その治療薬を関節リウマチ治療に適応拡大できる可能性が示唆された（乳癌における CDK4/6 阻害薬など。図 1 下段）

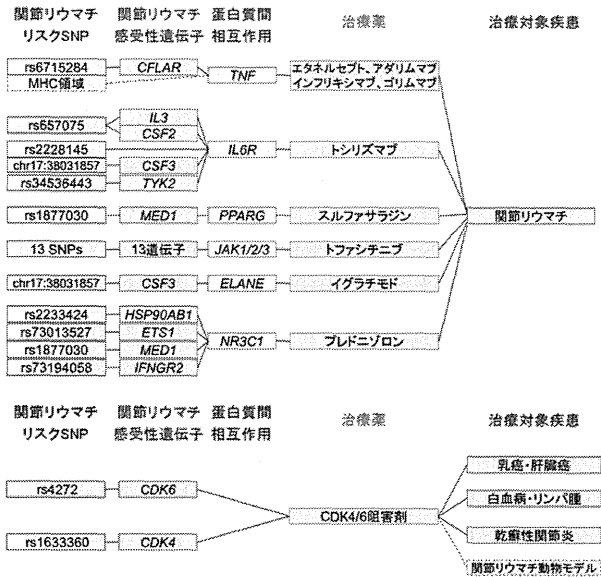


図 1：関節リウマチ感受性遺伝子と治療薬ターゲット遺伝子、治療薬治療対象疾患が形成するネットワーク

次世代シーケンサーを用いた rare variant 解析、長期観察コホートを用いた骨折リスク遺伝子の解析、RA における重要なサブタイプである抗 CCP 抗体陰性関節リウマチの原因遺伝子検索、疾患関連遺伝子の同定と臨床展開のための数理統計学的手法についても一定の結果が得られている。

D. 考察

ゲノムワイド関連解析の結果得られた疾患感受性遺伝子には、疾患病態の解明や創薬に有用な情報が含まれており、多様な生物学的・創薬データベースとの網羅的な解析を行うことによりそれらの情報を引き出すことが可能になると考えられた。本研究においては、これらのアプローチが関節リウマチにおいて有用なことが示され、今後は他の common disease

における有効性の検討も有用と考えられた。

E. 結論

大規模ゲノム研究を通じて、関節リウマチを含む common disease の疾患病態の解明や新規創薬への貢献が可能になると考えられた。創薬基盤整備に寄与すると考えている。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Okada Y, Wu D, Trynka G, Raj T, Terao C, Ikari K, Kochi Y, Ohmura K, Suzuki A, Yoshida S, Graham RR, Manoharan A, Ortmann W, Bhangale T, Denny JC, Carroll RJ, Eyler AE, Greenberg JD, Kremer JM, Pappas DA, Jiang L, Yin J, Ye L, Su DF, Yang J, Xie G, Keystone E, Westra HJ, Esko T, Metspalu A, Zhou X, Gupta N, Mirel D, Stahl EA, Diogo D, Cui J, Liao K, Guo MH, Myouzen K, Kawaguchi T, Coenen MJ, van Riel PL, van de Laar MA, Guchelaar HJ, Huizinga TW, Dieudé P, Mariette X, Louis Bridges Jr S, Zhernakova A, Toes RE, Tak PP, Miceli-Richard C, Bang SY, Lee HS, Martin J, Gonzalez-Gay MA, Rodriguez-Rodriguez L, Rantapää-Dahlqvist S, Arlestig L, Choi HK, Kamatani Y, Galan P, Lathrop M; the RACI consortium; the GARNET consortium, Eyre S, Bowes J, Barton A, de Vries N, Moreland LW, Criswell LA, Karlson EW, Taniguchi A, Yamada R, Kubo M, Liu JS, Bae SC, Worthington J, Padyukov L, Klareskog L, Gregersen PK, Raychaudhuri S, Stranger BE, De Jager PL, Franke L, Visscher PM, Brown MA, Yamanaka H, Mimori T, Takahashi A, Xu H, Behrens TW, Siminovitch KA,

- Momohara S, Matsuda F, Yamamoto K, Plenge RM. Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature* 506:376–81:2014.
- 2) Yoshida S, Ikari K, Furuya T, Toyama Y, Taniguchi A, Yamanaka H, Momohara S. A *GC* polymorphism associated with serum 25-hydroxyvitamin D level is a risk factor for hip fracture in Japanese patients with rheumatoid arthritis: 10-year follow-up of the Institute of Rheumatology, Rheumatoid Arthritis cohort study. *Arthritis Res Ther*, 2014. 16:R75.
- 3) Katayama M, Ohmura K, Yukawa N, Terao C, Hashimoto M, Yoshifuji H, Kawabata D, Fujii T, Iwakura Y, Mimori T. Neutrophils are essential as a source of IL-17 in the effector phase of arthritis. *PLoS One*. 2013, 8: e62231.
- 4) Cui J, Stahl EA, Saevarsdottir S, Miceli C, Diogo D, Trynka G, Raj T, Mirkov MU, Canhao H, Ikari K, Terao C, Okada Y, Wedrén S, Askling J, Yamanaka H, Momohara S, Taniguchi A, Ohmura K, Matsuda F, Mimori T, Gupta N, Kuchroo M, Morgan AW, Isaacs JD, Wilson AG, Hyrich KL, Herenius M, Doorenspleet ME, Tak PP, Crusius JB, van der Horst-Bruinsma IE, Wolbink GJ, van Riel PL, van de Laar M, Guchelaar HJ, Shadick NA, Allaart CF, Huizinga TW, Toes RE, Kimberly RP, Bridges SL Jr, Criswell LA, Moreland LW, Fonseca JE, de Vries N, Stranger BE, De Jager PL, Raychaudhuri S, Weinblatt ME, Gregersen PK, Mariette X, Barton A, Padyukov L, Coenen MJ, Karlson EW, Plenge RM. Genome-Wide Association Study and Gene Expression Analysis Identifies CD84 as a Predictor of Response to Etanercept Therapy in Rheumatoid Arthritis. *PLoS Genet*. 2013, 9: e1003394.
- 5) Terao C, Hashimoto M, Yamamoto K, Murakami K, Ohmura K, Nakashima R, Yamakawa N, Yoshifuji H, Yukawa N, Kawabata D, Usui T, Yoshitomi H, Furu M, Yamada R, Matsuda F, Ito H, Fujii T, Mimori T. Three Groups in the 28 Joints for Rheumatoid Arthritis Synovitis – Analysis Using More than 17,000 Assessments in the KURAMA Database. *PLoS One* 2013, 8: e59341.
- 6) Terao C, Ohmura K, Kawaguchi Y, Nishimoto T, Kawasaki A, Takehara K, Furukawa H, Kochi Y, Ota Y, Ikari K, Sato S, Tohma S, Yamada R, Yamamoto K, Kubo M, Yamanaka H, Kuwana M, Tsuchiya N, Matsuda F, Mimori T. PLD4 as a novel susceptibility gene for systemic sclerosis in a Japanese population. *Arthritis Rheum*. 2013, 65: 472–80.
- 7) Terao C, Hashimoto M, Furu M, Nakabo S, Ohmura K, Nakashima R, Imura Y, Yukawa N, Yoshifuji H, Matsuda F, Ito H, Fujii T, Mimori T. Inverse association between air pressure and rheumatoid arthritis synovitis: an observational study. *PLoS One* 2014, 9: e85376.
- 8) Hamaguchi Y, Fujimoto M, Matsushita T, Kaji K, Komura K, Hasegawa M, Koderama M, Muroi E, Fujikawa K, Seshima M, Yamada H, Yamada R, Sato S, Takehara K, Kuwana M. Common and Distinct Clinical Features in Adult Patients with Anti-Aminoacyl-tRNA Synthetase Antibodies: Heterogeneity within the Syndrome. *PLoS One* 2013, 8:e60442.
- 9) Terao C, Yoshifuji H, Kimura A, Matsumura T, Ohmura K, Takahashi M, Shimizu M, Kawaguchi T, Chen Z, Naruse TK, Sato-Otsubo A, Ebana Y, Maejima Y, Kinoshita H, Murakami K, Kawabata D, Wada Y, Narita I, Tazaki J, Kawaguchi

Y, Yamanaka H, Yurugi K, Miura Y, Maekawa T, Ogawa S, Komuro I, Nagai R, Yamada R, Tabara Y, Isobe M, Mimori T, Matsuda F. Two susceptibility loci to Takayasu arteritis reveal a synergistic role of the IL12B and HLA-B regions in a Japanese population. *Am J Hum Genet* 2013, 93(2) 289-97.

2. 学会発表

(口頭発表)

1) Okada Y, Wu D, Terao C, Ikari K, Kochi Y, Ikari K, Kochi Y, Ohmura K, Suzuki A, Yamanaka H, Denny JC, Greenberg JD, Graham RR, Brown MA, the RACI consortium, the GARNET consortium, Bae SC, Worthington J, Padyukov L, Klareskog L, Gregersen PK, Visscher PM, Siminovitch KA, Plenge RM. Biological Insights From Genetics of Rheumatoid Arthritis Contribute to Drug Discovery. *American College of Rheumatology Annual Meeting*, Oct, 28, 2013.

2) Okada Y, Wu D, Terao C, Ikari K, Kochi Y, Ikari K, Kochi Y, Ohmura K, Suzuki A, Yamanaka H, Denny JC, Greenberg JD, Graham RR, Brown MA, the RACI consortium, the GARNET consortium, Bae SC, Worthington J, Padyukov L, Klareskog L, Gregersen PK, Visscher PM, Siminovitch KA, Plenge RM. Biological Insights from Genetics and biology of rheumatoid arthritis contribute to drug discovery. *American Society of Human Genetics Annual Meeting*, Oct, 26, 2013.

3) Okada Y, Diogo D, Liao KP, Fulton RS, Graham RR et al. Potential of Integrating Human Genetics and Electronic Medical Records for Drug Discovery: The Example Of TYK2 and Rheumatoid Arthritis. *American College of Rheumatology Annual Meeting* 2013, Oct, 30, 2013.

4) 岡田随象 「ゲノム解析の時代からゲ

ノム創薬の時代へ」 日本人類遺伝学会第58回大会 シンポジウム Nov, 21, 2013.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得

本研究と関連するものはなし。

2. 実用新案登録

本研究と関連するものはなし。

3. その他

本研究と関連するものはなし。

II. 分担研究報告

分担研究報告書

NF- κ B関連遺伝子における関節リウマチ発症に関わるrare variantsに関する研究

研究分担者 山本 一彦 理化学研究所ゲノム医科学研究センター チームリーダー

研究要旨：関節リウマチ（RA）発症に関わる稀な変異（rare variants）を明らかにするため、RAの病態において重要な役割を果たしていると考えられるNF- κ B遺伝子ファミリーに注目し、次世代シーケンサーによるターゲットリシーケンシングを行った。ケース・コントロール関連解析の結果、NF- κ B遺伝子群には疾患に関わるrare variantが集積していることが明らかになった（ $P=0.0037$ ）。特に*IKBKAP*および*RELA*遺伝子において、ケース群においてrare variantsの数が有意に多くみとめられたため、これらのvariantは疾患発症のリスク因子となっている可能性が考えられた。今後、rare variantを用いた個人の病態予測モデルの樹立、およびこれらの遺伝子を標的とした治療法の開発が期待される。

研究分担者：山本 一彦
理化学研究所ゲノム医科学研究センター
チームリーダー

研究協力者：高地 雄太、明前 敬子
理化学研究所ゲノム医科学研究センター

連することが明らかになっている。本研究では、NF- κ Bシグナル伝達経路における主要16遺伝子（NF- κ Bファミリー、I κ Bファミリー、IKKファミリー）についてrare variantの同定を行い、RA感受性との関連を検討することを目的とした。

A. 研究目的

関節リウマチ（RA）のゲノムワイド関連解析（GWAS）によって、我々は100以上の遺伝子領域が疾患発症と関連することを明らかにしてきた。しかし、GWASのみでは、RAの遺伝素因を十分説明できるわけではないことも同時に明らかになっている。この、未同定の遺伝素因（missing heritability）を説明するものとしては、GWASが対象としてこなかった、集団での頻度の低い変異（rare variant）の関与が示唆されている。

NF- κ Bは免疫・炎症反応における多くの遺伝子の発現制御に関与する転写因子であるが、NF- κ Bシグナルに関与する*NFKBIE*、*RTKN2*、*TNFAIP3*、*REL*、*TRAF1*、*CD40*などの遺伝子多型がRA感受性と関

B. 研究方法

RA患者群563検体および健常人群564検体について、次世代シーケンサー（Ion PGM）を用いてNF- κ B関連遺伝子のコーディング領域をターゲットとしたシーケンシングを行った。ライブラリ調整にはHaloplex Target Enrichment（Agilent）を用い、readのtrimming、mappingおよびvariantの検出にはCLC genomics workbench（CLC bio）を用いた。検出したvariantsから1000 Genome projectのアジア人集団（日本人+中国人、計287人）においてマイナーアレルの頻度が0.01以下のvariantおよびデータベース上に登録されていないunique variantを解析に用いた。さらに、variantが遺伝子機能に与える影響をin silicoで評価するソフトであるSIFTを

用いて、遺伝子機能にダメージを与えると予測された variant を関連解析の対象とした。関連解析にはロジスティック関連解析および Sequence Kernel Association Tests (SKAT) を用いた。

表 1. NF- κ B 遺伝子ファミリー

遺伝子	長さ(bp)	機能
Iκ-B kinase (IKK)		
<i>IKBKA</i>	2238	I κ -Bのリン酸化
<i>IKBKB</i>	2271	
<i>IKBKE</i>	2151	
<i>IKBKG</i>	1464	
<i>IKBKAP</i>	3999	
Iκ-B		
<i>NFKBIA</i>	954	NF- κ Bの抑制
<i>NFKBIB</i>	1071	
<i>NFKBID</i>	942	
<i>NFKBIE</i>	1503	
<i>NFKBIZ</i>	2157	
<i>BCL3</i>	1365	
NF-κB		
<i>REL</i>	1860	転写制御
<i>RELA</i>	1656	
<i>RELB</i>	1736	
<i>NFKB1</i>	2907	
<i>NFKB2</i>	2703	
合計	30977	

(倫理面への配慮)

ヒトゲノム・遺伝子解析に関する実験および個人情報の取り扱いは、理化学研究所および研究協力機関の倫理委員会の承認を受け、同委員会の作製した指針(文部科学省、厚生労働省及び経済産業省合同ヒトゲノム・遺伝子解析研究指針に基づく)のもとに行った。

C. 研究結果

NF- κ B 関連 16 遺伝子のうち、15 遺伝子において遺伝子機能に影響を与えると予測される rare variant が同定された。コントロールでの各遺伝子の rare variant の数を比較すると、0~13 個と遺伝子間で差を認めた。まず、これらの variant の数を全遺伝子まとめたうえでケース・コントロール関連解析を行ったところ、有意な関連を認めた ($P < 0.05$)。次に、遺伝子ごとに関連解析を行ったところ、*IKBKAP*、*RELA*、*RELB* 遺伝子におい

て、ロジスティック回帰分析もしくは SKAT において有意な関連を認めた (表 2、 $P < 0.05$)。*RELB* 遺伝子においては、コントロールでの variant の頻度が高かったため、これらの variant は疾患に対して防御的に働いている可能性が考えられた。一方で、*IKBKAP*、*RELA* ではケースにおいて、variant の数が多く、疾患発症に対してリスク因子となっていると考えられた。特に、*RELA* 遺伝子においては、ケースのみに rare variant が集積しており、一部の variant は rel homology domain (RHD) といった遺伝子機能に重要と考えられるドメインに存在していた (表 3、図 1)。

表 2. 関連解析結果

遺伝子	SNV の数	変異アレルの数		関連解析	
		ケース	コントロール	ロジスティック 回帰分析	SKAT
<i>IKBKA</i>	2	1	1	0.25	0.67
<i>IKBKB</i>	4	4	3	0.14	0.24
<i>IKBKE</i>	5	18	13	0.32	0.45
<i>IKBKG</i>	1	1	0	0.24	0.48
<i>IKBKAP</i>	13	20	10	<u>0.024</u>	0.082
<i>NFKBIA</i>	0	0	0	-	-
<i>NFKBIB</i>	4	6	1	0.26	0.073
<i>NFKBID</i>	1	0	1	0.24	0.51
<i>NFKBIE</i>	1	1	0	0.24	0.48
<i>NFKBIZ</i>	5	5	2	0.32	0.43
<i>BCL3</i>	3	11	8	0.51	0.68
<i>REL</i>	4	4	4	0.43	0.77
<i>RELA</i>	4	5	0	0.14	<u>0.015</u>
<i>RELB</i>	3	5	9	<u>0.012</u>	<u>0.030</u>
<i>NFKB1</i>	4	2	3	0.14	0.21
<i>NFKB2</i>	3	2	2	0.43	0.93
全遺伝子	57	85	57	<u>0.0037</u>	<u>0.027</u>

表 3. RELA 遺伝子の rare variant

染色体	染色体位置	レファレンス アレル	変異 アレル	変異アレルの数		アミノ酸変化
				ケース	コントロール	
11	65425877	C	T	1	0	Arg253Gln
11	65425839	C	G	1	0	Val266Leu
11	65422363	G	A	1	0	Pro381Leu
11	65421986	C	T	2	0	Ala507Thr

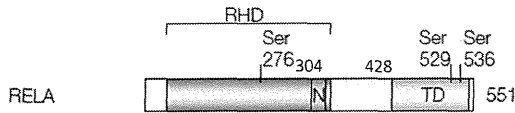


図 1 RELA 遺伝子構造

D. 考察

RA 患者検体を用いた NF- κ B 遺伝子ファミリー遺伝子のターゲットリシークエンシングおよび関連解析を行うことによつて、これらの遺伝子群に疾患発症に関わる rare variant が集簇していることが明らかになった。特に、*IKAP* および *RELA* 遺伝子においては、ケースにおいて variant の数が多いため疾患へのリスク因子になっていると考えられる。GWAS で明らかにされた疾患感受性多型は集団での頻度の高い common variant であり、遺伝子の機能へ与える機能は小さいものが多いと考えられている。一方で頻度の低い rare variant については十分な自然選択を経ていないものも多く、遺伝子機能に与えるインパクトの大きいものも存在すると考えられている。したがって、rare variant が個人の病態に与える影響も大きいことが考えられる。関連解析の結果からは *IKBKAP* および *RELA* の rare variant が疾患発症に関わっていることが示唆されたが、個々の variant が実際に病態に関与しているかについては、in vitro の解析系などを用いて variant の遺伝子機能へ与える影響を評価する必要がある。また、各遺伝子の関連は多重検定の補正を行うと有意性が消失するため、別セットを用いた追認解析が重要である。

E. 結論

NF- κ B ファミリーに遺伝子において

rare variants 解析を行った結果、NF- κ B ファミリー遺伝子群に疾患と関わる rare variant が集簇していることが明らかになった。今後、rare variant を用いた個人の病態予測モデルの樹立、およびこれらの遺伝子を標的とした治療法の開発につながることを期待される。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

3. 論文発表

- 1) 高地 雄太 関節リウマチのゲノム解析でわかったこと. *Medical Practice*, 2013. 30(4): 552-6.
- 2) 高地 雄太 日本人の関節リウマチ疾患感受性遺伝子. *炎症と免疫*, 2013, 21(2): 72-6.
- 3) Okada Y, Wu D, Trynka G, Raj T, Terao C, Ikari K, Kochi Y, Ohmura K, Suzuki A, Yoshida S, Graham RR, Manoharan A, Ortmann W, Bhangale T, Denny JC, Carroll RJ, Eyler AE, Greenberg JD, Kremer JM, Pappas DA, Jiang L, Yin J, Ye L, Su DF, Yang J, Xie G, Keystone E, Westra HJ, Esko T, Metspalu A, Zhou X, Gupta N, Mirel D, Stahl EA, Diogo D, Cui J, Liao K, Guo MH, Myouzen K, Kawaguchi T, Coenen MJ, van Riel PL, van de Laar MA, Guchelaar HJ, Huizinga TW, Dieudé P, Mariette X, Louis Bridges Jr S, Zhernakova A, Toes RE, Tak PP, Miceli-Richard C, Bang SY, Lee HS, Martin J, Gonzalez-Gay MA, Rodriguez-Rodriguez L, Rantapää-Dahlqvist S, Arlestig L, Choi HK, Kamatani Y, Galan P, Lathrop M; the RACI consortium; the GARNET consortium, Eyre S, Bowes J, Barton A, de Vries N, Moreland LW, Criswell LA, Karlson EW, Taniguchi A, Yamada R, Kubo M, Liu JS, Bae SC, Worthington J, Padyukov L,

Klareskog L, Gregersen PK, Raychaudhuri S, Stranger BE, De Jager PL, Franke L, Visscher PM, Brown MA, Yamanaka H, Mimori T, Takahashi A, Xu H, Behrens TW, Siminovitch KA, Momohara S, Matsuda F, Yamamoto K, Plenge RM. Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature* 506:376-81:2014.

4. 学会発表

1) 高地 雄太 関節リウマチ感受性遺伝子の同定および機能解析. 人類遺伝学会, 2013

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

4. 特許取得

本研究と関連するものはなし。

5. 実用新案登録

本研究と関連するものはなし。

6. その他

本研究と関連するものはなし。

分担研究報告書

次世代シーケンサーを用いた関節リウマチ関連 rare variant の探索に関する研究

研究分担者 松田 文彦 京都大学大学院医学研究科附属ゲノム医学センター 教授

研究要旨:関節リウマチ(RA)において、これまでの SNP アレイに基づいた全ゲノム関連解析で見出せなかった頻度が稀な疾患感受性遺伝子多型を同定するために、家系例および非家系例の DNA を用いて次世代シーケンサーにて全エクソン領域塩基配列決定を行った。非家系例では 69 例の RA 患者群の結果を基に、関節破壊の重篤な 68 例を用いて追認解析を施行し、合計 8 領域の候補を同定した。家系例については、SNP アレイも併用した。その結果、染色体 3 番上の領域の関与が強く示唆された。

研究分担者：松田 文彦
京都大学大学院医学研究科附属ゲノム医学センター 教授

研究協力者：寺尾 知可史
京都大学大学院医学研究科附属ゲノム医学センター 特定助教

に理化学研究所の統計解析チームにより既に確立された塩基配列決定法により、RA 患者の各塩基配列を決定した(第一セット)。次世代シーケンサーの異なるプラットフォームによる結果の乖離を避けるため、対照群として、同手法によってタイピングされた理化学研究所の他疾患のデータを用い、公開データベース(DBSNP, 1000 人ゲノム, EDP) および理研の in-house データベースのデータを基に、de novo mutation(新規遺伝子変異)の確定を行った。遺伝子ごとに de novo mutation に着目して変異を持つ個体が RA 群に集積されているかを Fisher の正確確率検定で評価した。その結果を、東京女子医科大学膠原病リウマチ痛風センターおよび京都大学大学院医学研究科附属ゲノム医学センターにて収集された関節破壊の重篤な 68 例と健常者 178 例の DNA を用いて追認解析を行った(第二セット)。追認解析では、第一セットと同様に sureslect にてエクソーム濃縮及び HiSeq による全エクソームシーケンスを行い、RA 群・対照群の各塩基配列を決定し、第一セットと同様に RA 群に de novo mutation 保有個体が集積していないかを検定し、第一および第二セットの結果を統合した。

A. 研究目的

関節リウマチ(RA)において、一般人口集団において頻度が低く、これまでのアレイに基づいた全ゲノム関連解析で見出せなかった稀な疾患感受性遺伝子多型を同定する。

B. 研究方法

東京女子医科大学膠原病リウマチ痛風センターを受診した RA 患者のうち、濃厚な家系例を示す一家系 8 名(患者を含めた同胞の 8 名のうち 4 名罹患)および、関節破壊の進行の早い RA 患者 69 名の合計 77 名を対象とした。末梢血白血球から DNA を抽出し、理化学研究所にてアジレント社の sureslect を用いてエクソーム濃縮を行い、イルミナ社の次世代シーケンサーである HiSeq を用いて全エクソームシーケンスを行った。それらデータを元

家族例については疾患群 4 例と非疾患群 4 例の比較を行い、分布の不均衡を示す de novo mutation および遺伝子領域、染色体領域の解析を行った。また、Illumina 社 Infinium Human Core Exome アレイを用いて SNP genotyping を行い、近縁関係の評価と染色体領域の絞り込みを行った。

(倫理面への配慮)

本研究はヘルシンキ宣言にのっとってデザインされ、各施設の倫理委員会で承認されたものである。対象者からは全員書面で同意を得た。同意の撤回の自由は保証されている。

C. 研究結果

家系例・非家系例ともに 10 回以上読まれた変異のみ解析に採用した。サンプルは call 成功率 80% のサンプルを採用した。非家系例では遺伝的に近縁関係にあると推定されたサンプルおよびコンタミネーションが疑われたサンプルは除外した。変異ではサンプルの Call 成功率が低いものは除外した。

非家系例について第一セットで p 値が 0.05 以下であったものは 216 遺伝子であった。これらの内、7 遺伝子が追認解析にても 0.1 以下の p 値を示した。また、メタ解析では、合計 8 遺伝子領域が合計 p 値 < 0.001 を示した。最も低い p 値を示す領域は染色体 21 番領域に存在する遺伝子であった ($p=2.1 \times 10^{-6}$)。この遺伝子については過去の報告で免疫学的な機能は報告されていなかった。また、de novo mutation に着目した解析を行い、第一セットで同定した RA4 名に変異を認めるもの 4 つ、3 名に変異を認めるもの 17 個の SNV について第二セットでも検証した。その結果、5 つの SNV について第二セットで RA に同一の変異を同定したが、いずれも対照群にも存在するか、RA1 例のみであった。次に、de novo mutation に限

らず、稀な exon 上の変異の分布の偏りを遺伝子ごとに評価を行った (C-alpha テスト)。対照群でアレル頻度 2.5% 以下の変異で Call 成功率 90% 以上の多型を対象に解析を行った結果、前回の報告で p 値 0.0005 以下を示す 12 領域について第二セットで検証した。その結果、染色体 12 の遺伝子一つが p 値 0.00036 を示した。

家系例については 8 名共に塩基配列が決定された遺伝子多型は 75395 個であり、内 19455 個が少なくとも一つの変異を家系内で認めた。1000 個の変異が患者群にのみ変異を認めた。両親は既に亡くなっており、RA でなく、DNA は得られていないが、常染色体優性遺伝の形式を想定して解析を行い、113 個が罹患患者 4 名のみに変異を認めた。罹患患者 4 名にのみ変異を認める de novo mutation は 3 つのみであり、その全てが 3 番染色体上にあり、アミノ酸変異をもたらすものであった。また、他の variant の分布の評価から、染色体 3 番の多くの領域が罹患患者 4 名で共有されている可能性が示された。次に、常染色体劣性遺伝の形式を想定して解析を行った。common variant に着目したイルミナ社のインフィニウムアレイを用い、8 名の genotyping を行った。このタイピング結果から、8 名の遺伝学的な関係の強さを通して家族関係を確認した。また、Case と Control の比較から、染色体 3 番の 1.1Mbp の領域を Case が共有していることを確認した。その領域上に Case が 4 人とも variant のホモを持ち、Control が全員 hetero の遺伝子型である rare variant は同定されなかった。

D. 考察

昨年度は疾患群とは異なるエクソーム濃縮の手法及びシーケンサーの違ったデータをコントロールデータとして用いたため、Call 成功率を始め相違があったものと考えられた。

非家系例については、RA に集積する特定

の de novo mutation は明らかでなかった。C-alpha テストでは前回の報告と同じ遺伝子が低い p 値を示したが、今回の解析では特定の ISNV が RA 群に集積していたためであり、慎重な評価が必要であると思われた。各遺伝子における de novo mutation 集積の有無の評価を行った結果、有望な候補遺伝子が複数同定された。SNV の機能解析や遺伝子そのものの機能解析によって RA の病態解明につながるものと考えられる。現在、さらに解析手法を洗練させるべく取り組んでいるところである。

家系例については祖先由来の 3 番染色体が強い浸透率を持って RA 発症にかかわっている可能性があると考えられた。3 番染色体は、これまでの全ゲノム関連解析において RA 発症との関連を示した領域は欧州人、アジア人共にごくわずかであり、それら遺伝子には疾患群のみに認める de novo mutation は認めず、他の遺伝子領域の関与が疑われた。この領域の機能解析により新規の RA 発症機能の解明につながる可能性がある。家系例について疾患群 4 例のみに認められた de novo mutation は非家系例については第一・第二セットともに一例も認めず、同じ遺伝子領域の de novo mutation の疾患群の集積は明らかでなく、原因領域同定の手掛かりは得られなかった。SNP アレイにて情報を補完したが、領域を決定するには至らなかった。また、罹患同胞の子供の世代は発症していないが、候補領域の機能解析に加えて今後のフォローアップによって、有益な情報が得られる可能性がある。

E. 結論

非家系例では、多重検定を考慮に入れても有意水準の p 値を示した染色体 21 番の領域を含めて合計 7 領域の RA 発症関連領域候補が同定された。家系例では染色体 3 番の疾患への関与が強く示唆された。さらなる先進的な統計的手法の開発や、

遺伝的多型や遺伝子そのものの機能解析によって領域の絞り込みや多型の決定、引いては RA の疾患発症機序の解明につながるものと考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

2. 3) Okada Y, Wu D, Trynka G, Raj T, Terao C, Ikari K, Kochi Y, Ohmura K, Suzuki A, Yoshida S, Graham RR, Manoharan A, Ortmann W, Bhangale T, Denny JC, Carroll RJ, Eyler AE, Greenberg JD, Kremer JM, Pappas DA, Jiang L, Yin J, Ye L, Su DF, Yang J, Xie G, Keystone E, Westra HJ, Esko T, Metspalu A, Zhou X, Gupta N, Mirel D, Stahl EA, Diogo D, Cui J, Liao K, Guo MH, Myouzen K, Kawaguchi T, Coenen MJ, van Riel PL, van de Laar MA, Guchelaar HJ, Huizinga TW, Dieudé P, Mariette X, Louis Bridges Jr S, Zhernakova A, Toes RE, Tak PP, Miceli-Richard C, Bang SY, Lee HS, Martin J, Gonzalez-Gay MA, Rodriguez-Rodriguez L, Rantapää-Dahlqvist S, Arlestig L, Choi HK, Kamatani Y, Galan P, Lathrop M; the RACI consortium; the GARNET consortium, Eyre S, Bowes J, Barton A, de Vries N, Moreland LW, Criswell LA, Karlson EW, Taniguchi A, Yamada R, Kubo M, Liu JS, Bae SC, Worthington J, Padyukov L, Klareskog L, Gregersen PK, Raychaudhuri S, Stranger BE, De Jager PL, Franke L, Visscher PM, Brown MA, Yamanaka H, Mimori T, Takahashi A, Xu H, Behrens TW, Siminovitch KA, Momohara S, Matsuda F, Yamamoto K, Plenge RM. Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature*

506:376-81:2014.

3. 学会発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得

本研究と関連するものはなし。

2. 実用新案登録

本研究と関連するものはなし。

3. その他

本研究と関連するものはなし。